

Abstract of D₂

Production of fatty acid alkyl esters by trans-esterification or esterification, useful for producing biodiesel fuel, comprises using catalyst prepared by immersing immobilized lipase in alcohol

Publication number: DE10217607

Publication date: 2002-10-31

Inventor: WU WEN-TENG (TW); CHEN JECH-WEI (TW)

Applicant: WU WEN-TENG (TW)

Classification:


- International: **C11C3/10; C12P7/62; C11C3/00; C12P7/62;** (IPC1-7):
C12P7/62; C07C69/24; C11C3/10

- European: C11C3/10; C12P7/62

Application number: DE20021017607 20020419

Priority number(s): TW20010109573 20010420

Also published as:

 FR2824075 (A

[Report a data error here](#)

Abstract of DE10217607

Production of fatty acid alkyl esters by trans-esterifying a fatty acid glyceride or esterifying a fatty acid with an alcohol having 1-3 carbon (C) atoms comprises using a catalyst prepared by immersing an immobilized lipase in an alcohol having at least 3 C atoms.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

Process for preparing lower alkyl fatty acid esters and in particular biodiesel

Description of corresponding document:

DE10217607

family member of TW 491890

Translate this text

D2

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf Verfahren zur Verbesserung der Aktivität einer immobilisierten Lipase und zur Regenerierung einer deaktivierten immobilisierten Lipase, wobei die immobilisierte Lipase insbesondere verwendbar ist in einem Verfahren zur Herstellung von Biodiesel durch Umesterung von Triglyceriden mit einem niederen Alkohol.

Hintergrund der Erfindung

In vielen Ländern, beispielsweise in Europa, USA und Japan und dgl., werden starke Basen als Katalysator in industriellen Verfahren zur Herstellung von Biodiesel verwendet, beispielsweise in dem US-Patent Nr. 5 354 878. Diese industriellen Verfahren (starke Basen-Verfahren) haben einen Produktionsumfang von mehreren Hunderttausend Tonnen. Dennoch leidet dieses starke Basen-Verfahren unter einigen schwerwiegenden Mängeln. So können beispielsweise in dem starke-Basen-Verfahren die erhaltenen Öle und Fette, die einen höheren Gehalt an Verunreinigungen aufweisen, nicht leicht gehandhabt werden. Die darin beschriebenen Verunreinigungen sind hauptsächlich Feuchtigkeit und freie Fettsäuren, die üblicherweise in ausgelassenen (ausgeschmolzenen) Feedstock-Ölen, ausgelassenen tierischen Fetten und ausgelassenen Ölen und ausgelassenen Fetten, wie sie bei der Raffinierung von Feedstock-Ölen gebildet werden, enthalten sind. Das Vorliegen dieser Verunreinigungen bewirkt, dass in einem starke Base-Verfahren viele unerwünschte Nebenprodukte (z. B. Seife) entstehen, wodurch die Ausbeute an Biodiesel verringert wird und die Reinigung des Biodiesel-Produkts erschwert wird. Deshalb werden in nahezu allen kommerziellen starke Basen-Verfahren zur Herstellung von Biodiesel reine pflanzliche Öle als Ausgangsmaterial verwendet.

Derzeit gibt es zwei Hauptschwierigkeiten bei der Verwendung von Lipase zur Herstellung von Biodiesel. Die erste Schwierigkeit besteht darin, dass die Aktivität der Lipase verhältnismässig gering ist. Nach einem Artikel von Watanabe et al. ["Continuous Production of Biodiesel Fuel from Vegetable Oil Using Immobilized *Candida antarctica* Lipase" in "JAOCS", Band 77, Seiten 355-360, 2000] sind bis zur Beendigung der Reaktion bei dem Lipase-Verfahren 36 h erforderlich, was signifikant länger ist als die eine Stunde, die bei dem starke Basen-Verfahren erforderlich ist. Eine weitere Schwierigkeit besteht darin, dass der Preis für die Lipase viel höher ist als der Preis für das in dem starke Basen-Verfahren verwendete Natriumhydroxid (NaOH). Wenn nicht eine immobilisierte Lipase mit einer verbesserten Aktivität verwendet wird und die Aktivität der immobilisierten Lipase nach mehrmaligem Recyclisieren nicht aufrechterhalten werden kann, kann ein Lipase-Verfahren mit dem starke Basen-Verfahren in Bezug auf die Herstellungskosten nur schwer konkurrieren.

Unglücklicherweise besteht die Gefahr, dass die immobilisierte Lipase durch einen niederen Alkohol vergiftet wird und dass die deaktivierte immobilisierte Lipase nicht so wirksam regeneriert werden kann, dass die zurückgewonnene Aktivität vergleichbar mit derjenigen der ursprünglichen immobilisierten Lipase ist. Deshalb sind bei der Entwicklung eines wirtschaftlich durchführbaren immobilisierten Lipase-Verfahrens oder gar bei dem Ersatz des konventionellen starke Basen-Verfahrens durch dieses die Gesichtspunkte, wie die Aktivität und die Gebrauchsdauer einer immobilisierten Lipase verbessert werden können und wie eine immobilisierte Lipase, die teilweise oder vollständig deaktiviert worden ist, wirksam regeneriert werden kann, sehr wichtig geworden.

Ein Ziel der vorliegenden Erfindung besteht darin, ein Verfahren zu finden, das für die Verbesserung der Aktivität einer immobilisierten Lipase geeignet ist. Ein weiteres Ziel der vorliegenden Erfindung besteht darin, ein Verfahren zum Regenerieren einer immobilisierten Lipase, die eine verminderte Aktivität aufweist, anzugeben. Noch ein weiteres Ziel der vorliegenden Erfindung besteht darin, ein Verfahren zur Herstellung eines Niedrigalkylfettsäureesters, insbesondere von Biodiesel, durch Umesterung oder Veresterung eines Fettsäurechlorids bzw. einer freien Fettsäure mit einem niederen Alkohol unter Verwendung einer vorbehandelten oder regenerierten immobilisierten Lipase als Katalysator zur Verfügung zu stellen.

Zusammenfassung der Erfindung

Die Erfinder der vorliegenden Erfindung nehmen an, dass die Abnahme der Aktivität bei der Umesterung eines Fettsäureglycerids mit einem niederen Alkohol hauptsächlich durch physikalische Faktoren verursacht wird, nämlich die Nicht-Mischbarkeit zwischen Methanol oder Ethanol und Fettsäureglyceriden. Infolgedessen wird dann, wenn Methanol oder Ethanol in den Hohlräumen einer immobilisierten Lipase absorbiert wird, der Eintritt des Fettsäureglycerids in die Hohlräume blockiert, wodurch der Ablauf der Reaktion gestoppt wird. Die Erfinder haben auch festgestellt, dass Methanol von der immobilisierten Lipase leichter absorbiert wird als ein Öl.

Die Erfinder der vorliegenden Erfindung beschreiben zum ersten Mal ein ideales Lösungsmittel zum Waschen einer deaktivierten immobilisierten Lipase. Dieses Lösungsmittel muss für die Lipase unschädlich sein und eine gute Löslichkeit für Öl, Fett, Feuchtigkeit und Methanol oder Ethanol aufweisen. Beispielsweise kann mit einem Alkohol mit drei oder mehr als drei Kohlenstoffatomen, vorzugsweise mit Isopropanol, 2-Butanol und tert-Butanol, eine deaktivierte immobilisierte Lipase wirksam regeneriert werden. Die Erfinder haben auch gefunden, dass die Aktivität einer immobilisierten Lipase signifikant erhöht werden kann, wenn ein solches ideales Lösungsmittel zur Durchführung einer Immersions-Vorbehandlung bei einer immobilisierten Lipase verwendet wird.

Bei einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird die Aktivität einer im Handel erhältlichen immobilisierten Lipase Novozyme 435 auf das 8- bis 10fache erhöht, verglichen mit einer solchen, die keiner Vorbehandlung unterzogen worden ist, und ein deaktiviertes Novozyme 435 kann erfolgreich regeneriert werden bis zu einem Aktivitätswert, der dem Wert vor der Vergiftung entspricht.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

Fig. 1 zeigt die anfängliche Reaktionsgeschwindigkeit einer bekannten Umesterungs-Reaktion in Abhängigkeit von der Konzentration verschiedener linearer Alkohole, wobei ein Quadrat für Methanol, ein Kreis für Ethanol, ein Dreieck für n-Propanol und ein umgekehrtes Dreieck für 1-Butanol stehen;

Fig. 2 zeigt die anfängliche Reaktionsgeschwindigkeit einer bekannten Umesterungs-Reaktion in Abhängigkeit von der Konzentration verschiedener verzweigter Alkohole, wobei ein Quadrat für Isopropanol, ein Dreieck für 2-Butanol und ein Kreis für Isobutanol stehen;

Fig. 3 zeigt die anfängliche Reaktionsgeschwindigkeit einer Umesterungs- Reaktion in Abhängigkeit von der Methanol-Konzentration, wobei ein schwarzes Quadrat für eine immobilisierte Lipase steht, die mit Isopropanol erfindungsgemäss vorbehandelt worden ist, ein nicht ausgefülltes Quadrat für eine bekannte Vorbehandlung mit Sojabohnenöl steht, ein Dreieck für eine erfindungsgemässe Vorbehandlung mit 2-Butanol steht und eine Raute für eine erfindungsgemässe Vorbehandlung mit tert- Butanol steht;

Fig. 4 zeigt die anfänglichen Umesterungs-Reaktionsgeschwindigkeiten von regenerierten immobilisierten Lipasen bei der optimalen Methanol- Konzentration durch Waschen mit Sojabohnenöl (schwarze Quadrate oder durch einmaliges Waschen (Dreieck) oder zweimaliges Waschen (nicht ausgefüllter Kreis) mit Isopropanol gemäss der vorliegenden Erfindung, wobei die Versuchsnummern 1 bis 8 auf der Abszisse jeweils das Molverhältnis von Öl zu Methanol (8 : 1; 5 : 1; 3 : 1; 3 : 2; 1 : 1; 2 : 3; 1 : 2 bzw. 1 : 3) bei den Umesterungs-Reaktionen, bei denen immobilisierte Lipasen deaktiviert wurden, angeben.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung eines C1-C3-Alkylesters einer Fettsäure durch Umesterung oder Veresterung eines Fettsäureglycerids bzw. einer freien Fettsäure mit einem C1-C3-Alkohol, das dadurch gekennzeichnet ist, dass zur Katalyse der Umesterung oder Veresterung eine vorbehandelte immobilisierte Lipase verwendet wird, wobei die vorbehandelte immobilisierte Lipase hergestellt worden ist durch Eintauchen einer immobilisierten Lipase in einen Alkohol mit einer Anzahl der Kohlenstoffatome von nicht weniger als 3 für eine Zeitspanne von vorzugsweise 0,5 bis 48 h, besonders bevorzugt von 0,5 bis 1,5 h.

Vorzugsweise weist der Alkohol mit einer Anzahl der Kohlenstoffatome von nicht weniger als 3 bis 8 und besonders bevorzugt 3 oder 4 Kohlenstoffatome auf, wie z. B. 1-Propanol, Isopropanol, 1-Butanol, 2-Butanol, Isobutanol oder tert-Butanol.

Die vorbehandelte immobilisierte Lipase wird vorzugsweise hergestellt, indem man die immobilisierte Lipase, nachdem diese aus dem Alkohol mit einer Anzahl der Kohlenstoffatome von nicht weniger als 3 entfernt worden ist, weitere 0,5 bis 48 h lang in ein pflanzliches Öl eintaucht.

Vorzugsweise ist die immobilisierte Lipase auf einem porösen Träger immobilisiert.

Vorzugsweise handelt es sich bei der immobilisierten Lipase um eine solche aus *Pseudomonas* oder *Candida*.

Bei dem erfindungsgemässen Verfahren kann die immobilisierte Lipase frisch oder deaktiviert sein.

Für den Fall, dass die immobilisierte Lipase eine deaktivierte immobilisierte Lipase ist, wird die vorbehandelte immobilisierte Lipase hergestellt durch Waschen der deaktivierten immobilisierten Lipase mit dem Alkohol, der eine Anzahl der Kohlenstoffatome von nicht weniger als 3 aufweist. Vorzugsweise wird die vorbehandelte immobilisierte Lipase hergestellt durch weiteres Eintauchen der deaktivierten immobilisierten Lipase für 0,5 bis 48 h in ein pflanzliches Öl nach dem Waschen der deaktivierten immobilisierten Lipase mit dem Alkohol, der nicht weniger als 3 Kohlenstoffatome aufweist.

Vorzugsweise wird der C1-C3-Alkylester hergestellt durch Umesterung des Fettsäureglycerids mit dem C1-C3-Alkohol. Bei dem C1-C3-Alkylester handelt es sich besonders bevorzugt um den Methylester und der Methylester wird hergestellt durch Umesterung eines Öls oder Fettes, das ein Triglycerid umfasst, z. B. eines pflanzlichen Öls, mit Methanol.

Der C1-C3-Alkylester wird vorzugsweise hergestellt durch Umesterung des Fettsäureglycerids mit dem C1-C3-Alkohol bzw. durch Veresterung der freien Fettsäure mit dem C1-C3-Alkohol. Besonders bevorzugt handelt es sich bei dem C1-C3-Alkylester um den Methylester und der Methylester wird hergestellt durch Umesterung eines Öls oder eines Fettes, das ein Glycerid umfasst, bzw. durch Veresterung einer freien Fettsäure mit Methanol, wobei es sich bei dem Öl oder dem Fett um ein pflanzliches Öl, ein tierisches Fett, ein recycliertes ausgelassenes Feedstock-Öl oder ein ausgelassenes Öl oder Fett, das bei der Raffinierung von Feedstock-Ölen gebildet wird, handeln kann.

Die erfindungsgemäss verwendbare immobilisierte Lipase unterliegt keiner speziellen Beschränkung und dabei kann es sich um solche handeln, wie sie aus dem Stand der Technik bekannt sind, beispielsweise aus US-A 4 798 793; 4 940 845; 5 156 963; 5 342 768; 5 776 741 und WO-89/01032.

Die Umesterungs-Reaktion oder Veresterungs-Reaktion eines Fettsäureglycerids bzw. einer freien Fettsäure mit einem niederen Alkohol, die durch eine immobilisierte Lipase katalysiert wird, zur Herstellung von Niedrigalkyl-Fettsäureestern einschliesslich Biodiesel, ist dem Fachmann auf diesem Gebiet bereits bekannt und kein Hauptmerkmal der vorliegenden Erfindung. Deshalb werden diese Reaktionen hier nicht näher beschrieben. Erfindungsgemäss sind die bevorzugten Bedingungen für die Umesterungsreaktion bzw. die Veresterungsreaktion eine Temperatur zwischen Raumtemperatur und 80 DEG C und ein Molverhältnis von Fettsäureglycerid bzw. freier Fettsäure zu dem niederen Alkohol von mehr als 1 : 1, vorzugsweise von etwa 3 : 1.

Erfindungsgemäss wurde zuerst der Einfluss verschiedener Alkohole, wie Methanol, Ethanol, n-Propanol, 1-Butanol, 2-Butanol, Isobutylalkohol und tert- Butanol, auf die Aktivität einer immobilisierten Lipase untersucht. Es wurde eine festgelegte Menge eines pflanzlichen Öls (5,7 g Sojabohnenöl von der Firma Taiwan Sugar Corp.) mit einem Alkohol in unterschiedlichen Molverhältnissen (Öl : Alkohol = 8 : 1; 5 : 1; 3 : 1; 3 : 2; 1 : 1; 2 : 3; 1 : 2; 1 : 3) gemischt und dann wurden 5 Gew.-% (bezogen auf das Gewicht des Öls) einer immobilisierten Lipase (Novozyme 435, hergestellt von der Firma Novo Nordisk Co., Dänemark) zugegeben, wobei die Lipase vorher 24 h lang in Öl eingetaucht worden war. Die Reaktion wurde in einem verschlossenen Reagenzglas in einer Inkubationskammer bei 30 DEG C bei einer Schüttelrate von 200 UpM 5 min lang durchgeführt. Nach der Reaktion wurde die Probe durch HPLC analysiert zur Bestimmung der Gehalte an Biodiesel und nicht-umgesetztem Öl. Die anfängliche Reaktionsgeschwindigkeit der immobilisierten Lipase wurde als Index für ihre Aktivität errechnet. Die Ergebnisse sind in den Fig. 1 und 2 dargestellt. Alle linearen niederen Alkohole (Methanol, Ethanol, Propanol und Butanol) sind bemerkenswert giftig für die immobilisierte Lipase in unterschiedlicher Stärke, wie Fig. 1 zeigt. Die Stärke der Vergiftung ist umgekehrt proportional zur Anzahl der Kohlenstoffatome des linearen niederen Alkohols. Ein Alkohol mit einer höheren Anzahl der Kohlenstoffatome ist weniger giftig für die immobilisierte Lipase.

Die Fig. 2 zeigt die Stärke der Vergiftung einer immobilisierten Lipase durch verzweigte Alkohole. Aus der Fig. 2 ist zu ersehen, dass die Stärke der Vergiftung durch einen verzweigten Alkohol niedriger ist als diejenige durch einen linearen Alkohol. Insbesondere sind die Kurven für Isopropanol und 2-Butanol nahezu horizontal, d. h. Isopropanol und 2-Butanol weisen keine offensichtliche Toxizität auf. Ausserdem kann tert-Butanol unabhängig von seiner Konzentration keine Bindung gegenüber Fettsäureglyceriden

ausbilden in Gegenwart der immobilisierten Lipase Novozyme 435 mit einer Umwandlung von Null.

In den oben genannten Versuchen wurden zwei wichtige Merkmale gefunden. Erstens erfuhren dann, wenn Novozyme 435 durch Methanol oder Ethanol vergiftet wurde, die Teilchen des Novozyme 435 eine beträchtliche Veränderung ihres Aussehens und ihre ursprünglich transparente goldene Farbe änderte sich in eine opake graue Farbe, begleitet von einem Aufquellen und Zusammenbacken der Teilchen. Zweitens wiesen Methanol und Ethanol eine schlechte Mischbarkeit mit einem pflanzlichen Öl auf. Wenn mehr als 1/9 der theoretischen Molmenge eines niederen Alkohols (Methanol oder Ethanol) dem Öl zugesetzt wurde (Alkohol : Öl > 1 : 3), ging die resultierende Mischung in einen Emulsionszustand über. Die Konzentration des niederen Alkohols, bei der der Emulsionszustand auftrat, war nahezu gleich der Konzentration, die eine Vergiftung der immobilisierten Lipase hervorrief. Ein höherer Alkohol wies eine bessere Mischbarkeit mit einem Öl auf. Ein Alkohol mit einer Anzahl von Kohlenstoffatomen, die 3 überstieg, war mit einem pflanzlichen Öl vollständig mischbar, mindestens bei einer Konzentration unterhalb des für die Umesterung eines Triglycerids erforderlichen theoretischen Molverhältnisses (Alkohol: Öl \leq 3 : 1).

Auf der Basis der beiden oben genannten Merkmale wurden Isopropanol und 2-Butanol, die keine offensichtliche Toxizität für das Novozyme 435 aufwiesen, und tert-Butanol, das gegenüber dem Fettsäureglycerid inert war, zur Durchführung einer Immersions-Vorbehandlung des Novozyme 435 in den folgenden Beispielen verwendet. Die Ergebnisse zeigen, dass die Immersions-Vorbehandlung nicht nur ungiftig für die immobilisierte Lipase ist, sondern unter bestimmten Umständen auch die Beständigkeit der immobilisierten Lipasen gegen Vergiftung durch Methanol und Ethanol verbessert. Ausserdem kann durch Verwendung von Isopropanol zum Waschen eines deaktivierten Novozym 435 auch die Aktivität von deaktiviertem Novozyme 435 zurückgewonnen werden.

Beispiel 1

Einfluss einer Vorbehandlung auf die Aktivität der immobilisierten Lipase

0,3 g der immobilisierten Lipase Novozyme 435 (gekauft von der Firma Novo Nordisk Co., Dänemark) wurden in ein Reagenzglas gegeben und verschlossen und dann in unterschiedliche Lösungsmittel (Sojabohnenöl, Biodiesel, Isopropanol, 2-Butanol, tert.-Butanol und n-Hexan) eingetaucht, um die Lipase-Teilchen aufquellen zu lassen, oder, als Kontrolle, nicht eingetaucht. Die Eintauch-Bedingungen waren wie in der Tabelle 1 angegeben.

Jede der eingetauchten Lipasen und die Kontrolllipase wurden mit 5,7 g Sojabohnenöl und 0,26 ml Methanol versetzt zur Durchführung der Reaktion in einer Inkubationskammer bei 30 DEG C unter Schütteln mit 200 UpM für 30 min. Nach Beendigung der Reaktion wurden 0,1 g der Probe entnommen und mit 10 ml n-Hexan verdünnt und dann durch HPLC analysiert, wobei die Gehalte an Methylester und nicht-umgesetztem Öl erhalten wurden. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 1 angegeben.

Die Ergebnisse der Tabelle 1 zeigen, dass die Vorbehandlung für die immobilisierte Lipase sehr wichtig ist. Wenn die Lipase in einen nicht-toxischen Alkohol (Isopropanol, 2-Butanol, tert.-Butanol) eingetaucht wird, beträgt die Ausbeute an Methylester etwa das 7fache derjenigen einer immobilisierten Lipase, die nicht vorbehandelt worden ist. Das Eintauchen in einen nicht-toxischen Alkohol ergibt einen besseren Effekt als das Eintauchen in Biodiesel, wobei die Aktivität der mit dem erstgenannten vorbehandelten immobilisierten Lipase um 40% höher ist als bei der Vorbehandlung mit letzterem. Wenn n-Hexan für die Eintauch-Vorbehandlung verwendet wird, liegt die Aktivität der vorbehandelten immobilisierten Lipase nahe bei derjenigen einer immobilisierten Lipase, die nicht vorbehandelt worden ist. Dies zeigt, dass n-Hexan eine hohe Toxizität für Novozyme 435 aufweist. Wenn eine immobilisierte Lipase erfindungsgemäss vorbehandelt worden ist, steigt nicht nur signifikant die anfängliche Aktivität der vorbehandelten immobilisierten Lipase, sondern es weist auch die behandelte Lipase eine hohe Beständigkeit gegen die Toxizität von Methanol auf, wie das folgende Beispiel zeigt.

Tabelle 1

Effekt

Einfluss der Vorbehandlung auf die Reaktionsaktivität EMI11.1

Beispiel 2

Vergiftung von vorbehandelter immobilisierter Lipase mit Methanol in unterschiedlichen Konzentrationen

Novozyme 435, das getrennt mit drei unterschiedlichen nicht-toxischen Alkoholen und einem pflanzlichen Öl vorbehandelt worden war, wurde mit 5,7 g eines pflanzlichen Öls (Sojabohnenöl der Firma Taiwan Sugar Corp.) und Methanol in einem unterschiedlichen Molverhältnis (Öl : Methanol = 8 : 1; 5 : 1; 3 : 1; 3 : 2; 1 : 1; 2 : 3; 1 : 2; 1 : 3) versetzt und die Reaktion wurde in einer Inkubationskammer bei 30 DEG C 5 min lang unter Schütteln mit 200 UpM durchgeführt. Nach Beendigung der Reaktion wurden 0,1 g der Probe entnommen und mit 10 ml n- Hexan verdünnt und dann durch HPLC analysiert, wobei die Gehalte an Methylester und nicht-umgesetztem Öl erhalten wurden. Die anfängliche Reaktionsgeschwindigkeit der immobilisierten Lipase wurde dann als Index der Aktivität der immobilisierten Lipase errechnet. Die Ergebnisse sind in der Fig. 3 dargestellt.

Die anfängliche Reaktionsgeschwindigkeit der mit einem nicht-toxischen Alkohol vorbehandelten immobilisierten Lipase ist beträchtlich höher als diejenige der nur in ein pflanzliches Öl eingetauchten immobilisierten Lipase, wenn die Methanol-Konzentration zunimmt, wie in Fig. 3 dargestellt. Durch das Eintauchen in einen nicht-toxischen Alkohol wird tatsächlich die Beständigkeit der immobilisierten Lipase gegenüber Methanol verbessert, wobei Isopropanol und 2-Butanol einen besseren Effekt aufweisen.

Beispiel 3

Regenerierung der Aktivität der immobilisierten Lipase, die mit Methanol in unterschiedlicher Konzentration vergiftet worden ist

Novozyme 435, das durch Eintauchen für 1 h in Biodiesel, Waschen mit Sojabohnenöl und anschliessendes Eintauchen über Nacht in Sojabohnenöl vorbehandelt worden war, wurde mit einer festgelegten Menge Öl (Sojabohnenöl der Firma Taiwan Sugar Corp.) versetzt und dann mit verschiedener Mengen Methanol in unterschiedlichen Reagenzgläsern versetzt. Die Methanol- Konzentration in den Reagenzgläsern stieg in bezug auf das Molverhältnis von Öl : Methanol gleichmässig an: Molverhältnis Öl : Methanol = 8 : 1; 5 : 1; 3 : 1; 3 : 2; 1 : 1; 2 : 3; 1 : 2; 1 : 3, wobei diesen Molverhältnissen die entsprechenden Versuchsnummern 1 bis 8 zugeteilt wurden. Die resultierenden Mischungen wurden nach dem Verschliessen der Reagenzgläser geschüttelt, um die Lipasen teilweise oder vollständig zu deaktivieren. Die deaktivierten Lipasen wurden den nachfolgenden Wascharbeitsgängen unterzogen, um festzustellen, ob die Aktivität wieder hergestellt werden konnte.

Wascharbeitsgang 1: dreimaliges Waschen mit Sojabohnenöl und Eintauchen in Sojabohnenöl in einer Inkubationskammer über Nacht bei 30 DEG C.

Wascharbeitsgang 2: dreimaliges Waschen mit Isopropanol, Auswaschen von Isopropanol mit Sojabohnenöl und Eintauchen in Sojabohnenöl in einer Inkubationskammer über Nacht bei 30 DEG C

Wascharbeitsgang 3: Durchführung nach Durchführung des Wascharbeitsganges 2, Deaktivieren der Lipase in der Reaktion bei einer optimalen Methanol- Konzentration und anschliessende erneute Durchführung des Wascharbeitsganges 2 mit der deaktivierten Lipase.

Dann wurden die Aktivitäten der Lipasen, nachdem diese den Wascharbeitsgängen unterworfen worden waren, bewertet durch Wiederholung der Verfahren des Beispiels 2, jedoch mit der Ausnahme, dass eine optimale Methanol- Konzentration verwendet wurde (Öl : Methanol = 3 : 1). Die Ergebnisse sind in der Fig. 4 dargestellt.

Wie in der Fig. 4 gezeigt, verschwinden die Aktivitäten der Lipasen, nachdem sie dem Wascharbeitsgang 1 unterzogen worden sind (Waschen mit Sojabohnenöl) nahezu vollständig für deaktivierte Lipasen in den Versuchen Nr. 6 bis 8, in denen die Anzahl der zugegebenen Mole an Methanol diejenige an Sojabohnenöl übersteigt, d. h. bei den schwarzen Quadraten der Versuchs-Nummern 6, 7 und 8. Nachdem sie mit Isopropanol (dem Wascharbeitsgang 2) gewaschen worden sind, nehmen die Aktivitäten der regenerierten immobilisierten Lipasen in den Versuchen Nr. 6 und Nr. 7 signifikant zu bis zu dem Wert vor der Vergiftung

Die Erfindung wurde zwar vorstehend unter Bezugnahme auf spezifische Einzelheiten bestimmter Ausführungsformen derselben näher beschrieben, der Bereich der Erfindung ist jedoch keineswegs auf diese Details beschränkt und der Bereich der Erfindung ergibt sich ausschliesslich aus den nachstehenden Patentansprüchen. Unter Berücksichtigung der vorstehenden Angaben sind innerhalb des Rahmens der Erfindung viele Modifikationen und Abänderungen möglich.

<http://v3.espacenet.com/textdes?DB=EPODOC&IDX=TW491890B&F=8&QPN=TW4...> 2007-1-30